

Toxicogenomics responses in the in vitro liver : a view on human interindividual variation

Citation for published version (APA):

Jetten, M. J. A. (2014). *Toxicogenomics responses in the in vitro liver : a view on human interindividual variation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/dis.20141205mj>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20141205mj](https://doi.org/10.26481/dis.20141205mj)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

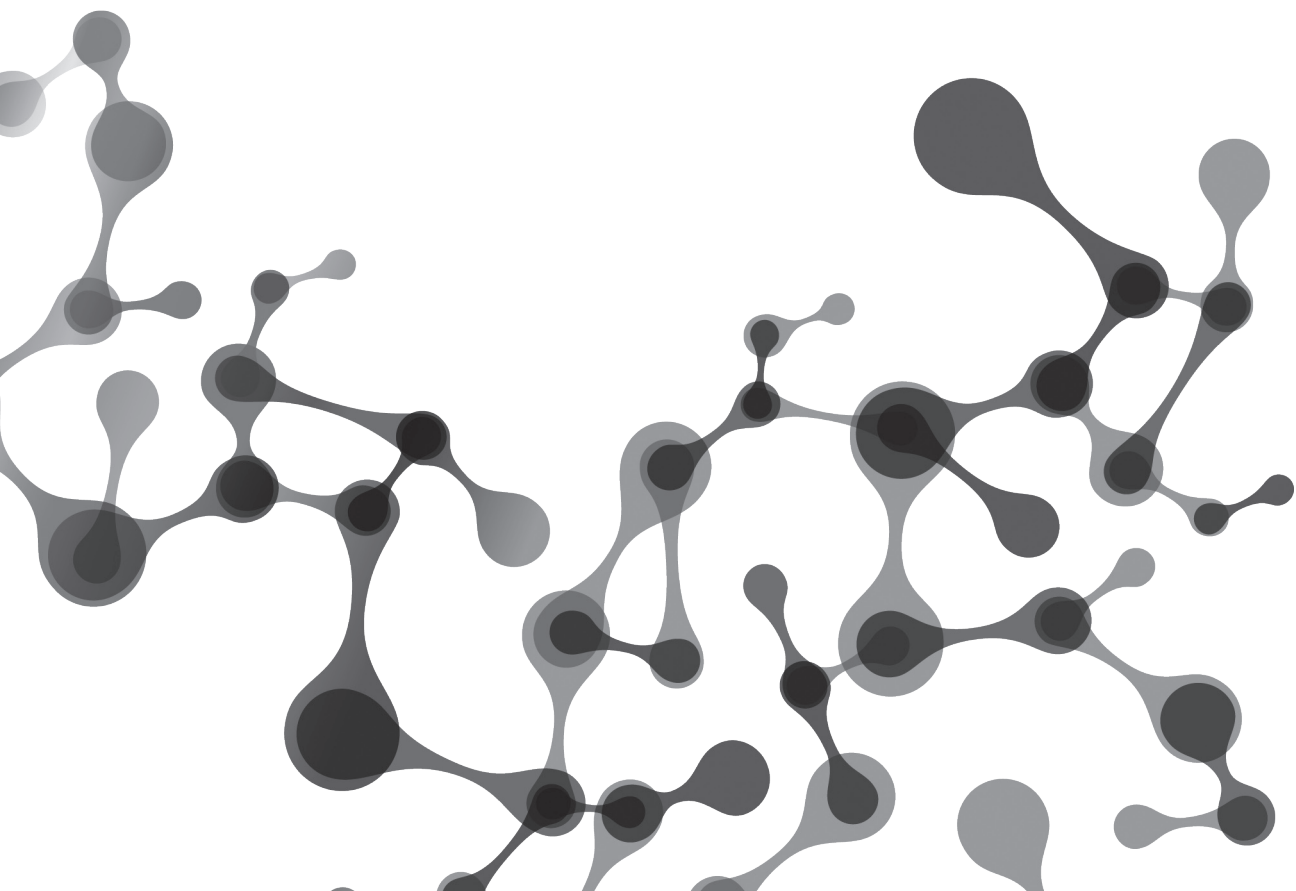
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 7

Summary and general discussion
Samenvatting en algemene
discussie



Interindividual variation in response to the exposure to chemical compounds is a well-known phenomenon within the human population. [1-3]. Amongst others, genetic factors have been proposed as causative factors for human interindividual variation [1, 2]. For instance, interindividual variation in cytochrome P450 (CYP) enzyme expression and/or activity has been linked to idiosyncratic responses to drugs and to susceptibility to carcinogenesis [4-7]. Nevertheless, the variation in the before mentioned factors seems not enough to fully explain the variation in responses between individuals. Therefore, we assume that many of the causative factors for interindividual variation and the molecular mechanisms underlying this variation are still unknown.

In addition, interindividual variation in responses to compound exposure is a major complicating factor in human risk-estimation procedures [8]. In an attempt to include interindividual variation in the process of risk-estimation for a compound (excluding genotoxic carcinogens), the 100-fold safety factor has been postulated [9]. This factor is composed of two separate factors both representing a 10-fold safety margin. The first 10-fold margin is applied to extrapolate animal-derived data, the current golden standard in toxicological research, to the human situation, assuming that humans are more susceptible to toxicity than animals [10, 11]. Then, another 10-fold margin is applied that should compensate for the interindividual variation in susceptibility to induced toxicity within the human populations [9, 12]. As such, this 100-fold factor should allow the animal-based estimation of a dose for a particular compound that can be considered safe for humans when exposed on daily basis. However, the 10-fold factor for interindividual variation in susceptibility within the human population is currently under discussion [13]. Better knowledge of the variation within the human population as such and in the molecular mechanisms underlying adverse responses to compounds may help to develop less arbitrary procedures for human risk estimate.

In addition, the use of animals for toxicity testing comes with ethical and moral dilemmas in addition to a heavy financial burden [14]. Also, the reliability and applicability of animal model-derived data towards the human situation has been questioned over the recent past [14]. Furthermore, rodent laboratory models are inherent to an inbred genetic background and thus by default, do not allow for the evaluation of interindividual variation within the human population. Overall, the above mentioned issues demonstrate the need for, better, *in vitro* models preferably optimised for application to the human situation.

The liver is the major organ involved in the bio-activation of chemical compounds into reactive metabolites. Therefore, this organ is the main candidate for the development of human *in vitro* models for the assessment of compound exposure-related toxicity responses [15]. Several liver carcinoma-derived cell lines are available and these are regularly used in toxicological research [16-20]. However, these cell lines do not allow for the evaluation of interindividual variation. Since the hepatocyte is the main cell type in the liver, these cells are of special interest for the development of an *in vitro* model that aims at representing the human liver [21-23]. Also, since primary human hepatocytes (PHH) can be isolated from any viable human liver donor tissue, evaluation of interindividual variation in toxic responses is feasible. Yet another *in vitro* model for the human liver is represented by precision-cut human liver tissue slices. In this model, the natural integrity of the liver is not disturbed and all liver cell types (so, not only hepatocytes) are represented [21]. As is the case with primary human hepatocytes, slices can be prepared from any available, viable human liver tissue and enables the possibility to determine interindividual variation.

In addition to better cellular models for evaluating toxic reactions, also better techniques to study genome-wide responses to compound exposure have become available; the so-called 'omics or array-based techniques. These techniques promise a higher sensitivity than conventional toxicological assays. They should be able to detect responses to compound exposure at lower doses even before the onset of a phenotypic response, thus increasing the predictive value of such assays [24-27]. Also, due to their ability to measure genome-wide responses, these technologies allow us to study the molecular mechanisms underlying compound-related responses. Chips to study gene expression were among the first type of arrays that became available, but these have now been complemented with, amongst others, miRNA and gene methylation platforms thus enabling the study of epigenetic effects of compound exposure complementarily to responses at the gene expression level.

In this thesis, our hypothesis has been that 'omics data derived from *in vitro* models for the human liver will enable us to pinpoint genes/gene sets that predispose for increased susceptibility of an individual upon being challenged by xenobiotics. Also, implementing epigenomics techniques should enable us to evaluate whether the epigenetic status of an individual influences the susceptibility of this individual to toxic challenges.

Evaluation of interindividual variation using precision cut human liver slices

In **Chapter 2** we have used precision cut human liver slices to evaluate whether interindividual variation in baseline enzyme activity (EA) and gene expression (GE) levels in the liver predispose for the variation in toxicity responses, based on assessing dose-response relationships for several prototypical hepatotoxicants. Baseline levels of CYP GE and EA were measured in precision-cut human liver slices. In addition, slices were exposed to a dose-range of acetaminophen (APAP), aflatoxin B1 (AFB), benzo(α)pyrene (BaP) or 2-nitrofluorene (NF). Interindividual variation in induced genotoxicity (COMET-assay and CDKN1A/p21 GE) and cytotoxicity (lactate dehydrogenase-leakage), combined with NQO1- and GSTM1-induced GE-responses for oxidative stress and GE-responses of several CYPs, was evaluated. The benchmark dose (BMD)-approach was applied as a tool to model exposure responses on an individual level.

Variation in baseline CYP levels, both GE and EA, appears to explain the variation in compound exposure-responses on an individual level. Network analyses enable the definition of key parameters influencing interindividual variation after compound exposure. For NF, this analysis suggests involvement of CYP1B1 in the metabolism of this compound, which represents a novel finding. Furthermore, GSTM1 which is known to be highly polymorphic in expression within the human population, but so far could not be linked to toxicity in APAP-poisoned patients, is suggested to be associated with interindividual variability in APAP-metabolism, depending on the individual's expression levels of CYP-enzymes.

This study demonstrates that using interindividual variation within network modelling provides a method for the definition of essential and even new parameters involved in compound-related metabolism. Out of all compounds, the interindividual variation in the cytotoxicity response derived BMDs was the largest after APAP-exposure (400-fold). This high interindividual variability corresponds with reports from literature on high variability within the human population with respect to sensitivity for toxicity responses to APAP [28]. In addition, this variation well exceeds the 10-fold margin to correct for interindividual variation that is currently taken into account in risk-estimate procedures. This information stresses the need for a more thorough evaluation of interindividual variation in toxic response, in the context of the necessity to improve the quantitative estimate of human risks.

For AFB, BaP and NF the fold-differences in interindividual variation in the cytotoxicity response derived BMDs were much lower (6, 54, and 4-fold respectively).

Interindividual variation in primary human hepatocytes

Chapter 3 focusses on the interindividual variation in gene expression responses and metabolite formation in primary human hepatocytes (PHH) exposed to APAP. APAP is a readily available over-the-counter drug and is one of the most commonly used analgesics/antipyretics world-wide [29, 30]. Although large interindividual variation in susceptibility towards APAP-induced liver failure has been described, the exact underlying factors causing this variability in susceptibility are still largely unknown [31, 32].

To better understand this variability in response to APAP, interindividual differences in gene expression changes and APAP-metabolite formation in PHH from several donors exposed *in vitro* to a non-toxic to toxic APAP dose-range were evaluated. The interindividual variation in gene expression levels was correlated with the interindividual variation in APAP-metabolite levels to evaluate whether differences in gene expression levels could explain the differences in levels of APAP-metabolite formation. Gene set over-representation analysis was applied to enable biological interpretation of the transcriptomic results.

The biological processes in which the genes with high interindividual variation in expression are involved, include liver regeneration, inflammatory responses, mitochondrial stress responses, hepatocarcinogenesis, cell cycle and drug-efficacy. Additionally, the interindividual variation in the expression of these genes could be associated with the variability in the metabolite levels of hydroxyl-APAP, methoxy-APAP and C8H13O5N-APAP-glucuronide. These genes/metabolites may thus be of interest with respect to drug-induced liver injury, especially when they can be confirmed in a human *in vivo* situation as is described in **Chapter 6**. In addition, interindividual variation in gene expression levels in general appeared to exceed the variation in metabolite levels.

As mentioned before, cell lines are currently widely used as an *in vitro* model for the human liver in toxicological research. However, these cell lines do not allow for the evaluation of interindividual variation. In **Chapter 4** we evaluate to what extent the data derived from several cell lines, is similar to the data derived from PHH, an *in vitro* model that

does include interindividual variation. While previous studies have mainly focused on the comparability/applicability of these cell types based on their baseline biotransformation capacities/CYP-inducibility [33-35], we chose for a genome-wide gene expression profile- based approach both at baseline and at compound-induced gene expression levels. Therefore, we compared baseline and AFB- and BaP-induced gene expression profiles in HepG2, HepaRG and PHH.

At baseline, liver models differ from each other with respect to whole genome gene expression levels. PHH are characterized, as expected, by profound interindividual differences, and are most similar to HepaRG. After compound exposure, induced gene expression profiles are more similar between cell models, especially upon BaP treatment. Pathways involved in compound metabolism, are induced in all 3 models, while others are more pronounced in a specific cell model. Examples are transcriptomic modifications of carbohydrate-related genes (HepaRG) and of receptor-related genes (PHH) after BaP exposure, and of cell cycle-related genes (HepG2) after AFB treatment. Thus, at baseline level, PHH are more similar to HepaRG than to HepG2, but for toxicogenomics applications both cell lines perform equally well in comparison to PHH. However, the interindividual variation in the PHH-model provides a much broader and more heterogeneous picture of the responses to compound exposure. Since this variation cannot be captured by any of the cell line models, their application in toxicity-risk evaluation implies an incomplete evaluation in relation to the human population.

Now that we have established clear interindividual differences in baseline transcriptomics and in compound-induced gene expression levels, the question remains what causes these interindividual responses. The influence of epigenetic factors, e.g. gene-methylation, has been proposed as an additional factor that could explain the differences in chemically induced gene expression levels in the human population. Therefore, in **Chapter 5** we focus on determining to what extent the baseline methylation status of a gene influences the expression of that gene in response to compound exposure. In this context, special emphasis has been put on the interindividual variation of the DNA-damage response.

In primary human hepatocytes of several donors exposed to AFB or BaP (see **Chapter 4**) the response to DNA-damage was evaluated by μ H2Ax-staining. Results were used to split the study-population into two groups per compound; a low and a high responder group, based

on the BMD for each response. Genes unique in their gene expression responses for either one of these groups were evaluated with regard to their baseline methylation status and baseline gene expression levels.

Although clear differences in responses to DNA-damage between high and low responders could be defined, baseline methylation status seems to only marginally contribute to this variation. Also, interindividual variation in baseline gene expression levels does not seem to be related to the variation between individuals in baseline methylation levels, which in turn is not reflected in the interindividual variation in gene expression responses. Thus, the general conclusion is that the interindividual variation in baseline methylation status only provides limited information on the susceptibility to carcinogen exposure of groups/individuals. Possibly, the regulatory mechanism through gene methylation is more complicated than currently acknowledged. Including other (epi)genetic factors, such as the influence of miRNAs, may help our interpretation and understanding of interindividual variation.

Interindividual variation in human *in vivo* responses

Although *in vitro* human liver models so far have been proven useful to evaluate interindividual variation, the ultimate model is of course the human liver *in vivo*. However due to obvious ethical constraints, intentional exposures to toxic doses of a compound cannot be performed using this model. Furthermore, it is evident that due to its anatomical position, accessibility to the liver is limited. However, blood has been proven as a useful reference or surrogate tissue to monitor liver function, including the response to xenobiotic exposure [36-38].

In **Chapter 6** we have evaluated the interindividual differences in blood cell transcriptomics responses of several volunteers exposed to relatively low, therapeutic doses of APAP. A battery of standard clinical liver chemistry tests was used to monitor for possible signs of liver damage. A procedure similar to the one used in **Chapter 2** was applied to evaluated gene expression changes after APAP exposure. Also, interindividual variation in APAP-metabolite formation in blood and urine was determined. To our knowledge, this is the first study to evaluate full-genome human miRNA expression changes in blood cells from healthy human volunteers exposed to APAP.

Many known and several new APAP-metabolites could be detected, in particular in relation to the oxidative route of APAP

metabolism which is often linked to the hepatotoxicity-related effects of APAP. Also, the metabolites mentioned in **Chapter 2** as being of possible interest in the perspective of drug-induced liver injury, are confirmed in this *in vivo* study. Transcriptomic changes indicate immune-modulating effects and oxidative stress responses to APAP.

'Omics techniques outperform clinical chemistry tests and reveal novel response pathways to APAP in humans. Although no definitive conclusion about potential immuno-toxic effects of APAP can be drawn from this study, there are clear indications that the immune system is triggered even after intake of low doses of APAP. Also, oxidative stress-related gene expression responses, similar to those seen after high dose APAP exposure, suggest the occurrence of possible pre-toxic effects of therapeutic APAP-doses. Possibly, these effects are related to dose-dependent increases in levels of hepatotoxicity-related metabolites. In addition, the interindividual variation in miRNA expression patterns can be related to the interindividual variation in gene expression responses. Therefore, miRNAs should be considered as a useful addition to the knowledge needed to explain the interindividual variation within the human population.

Conclusions

Network analysis (**Chapter 2**) proved useful in defining baseline CYP gene expression and enzyme activity levels as key parameters influencing interindividual variation after compound exposure. The high interindividual variation in metabolizing genes, mainly CYPs, could be confirmed in **Chapter 5**.

At baseline gene expression levels, PHH are very different from HepaRG and HepG2, two carcinoma-derived cell models that are currently used in toxicity testing (**Chapter 4**). PHH, HepaRG and HepG2 become more similar with respect to their gene expression profiles after compound exposure. Nevertheless, the PHH-model gives a much broader and more heterogeneous picture of the responses to compound exposure due to the inclusion of the interindividual variation between donors.

Interindividual variation in gene expression responses could be detected in all non-carcinoma based *in vitro* and *in vivo* liver models applied in this thesis (**Chapter 2, 3 and 6**). Interindividual variation in some parameters is found to exceed the 10-fold margin that is supposed to represent a measure for interindividual variation within the

human population in toxicity testing. These factors include BMDs for gene expression responses and cytotoxicity responses, but also levels of metabolite formation. In addition, inclusion of data on interindividual variation in miRNA expression levels could prove helpful in an attempt to explain the large variation between individuals in responses to APAP exposure in the human population (**Chapter 6**).

The combination of multiple 'omics techniques (e.g. genomics and proteomics) has been proven very useful in defining metabolites that could be used to monitor interindividual variation in the response to APAP-exposure (**Chapter 3 and 6**). The addition of epigenetic data in an attempt to explain interindividual variation was more successful with the addition of information on miRNA expression than with the addition of methylation-related data (**Chapter 5 and 6**).

Overall, the research performed in this thesis confirms the occurrence of considerable interindividual variation in responses to toxic exposures within the human population. Baseline CYP enzyme activity and gene expression levels as well as compound-induced genotoxicity, cytotoxicity and gene expression levels all show clear variation between liver cells from individual donors. In our opinion, implementation of knowledge gained on human interindividual variation should lead to the development of less arbitrary procedures for human risk estimate and a better understanding of the molecular mechanisms underlying responses to compounds

Recommendation for future directions

An increased awareness for the importance of the evaluation of interindividual variation has been established over the years, together with an increased demand for the replacement of animal models. However to be able to fully understand interindividual variation in toxic responses, massive amounts of data from a large group of individuals will need to be collected, in order to be able to create a dataset that reliably represents heterogeneity within the human population. For this a relevant human cell model that also is easily accessible and applicable on a large scale, is needed. In the case of liver models, this is not (yet) available. The existing cell lines that are numerous available and cheap, do not allow for interindividual variation. PHH and liver slices are not available in large amounts and come with heavy technical demands.

Recently, several new *in vitro* models have been developed. One of these models is based on hepatocyte-like cells that can be

derived from the differentiation of human embryonic stem cells [39]. Another similar model is based on induced human pluripotent stem cells [40]. This model has the advantage that the cells derived from the stem cells, should have a genetic background that is close to normal hepatocytes. Furthermore, culture methods have progressed, allowing for the culturing of cells in 3D or micro-tissue formation. These new culture conditions should mimic the natural surroundings of the cell in the liver and should, amongst others, enhance the metabolic capacities of the cells in comparison to the regular 2D cultures [40]. In addition, so called co-cultures which include both primary parenchymal and non-parenchymal hepatic cells have been developed. Also these cell models represent a more *in vivo*-like representation of the liver with improved functional capabilities [41]. All of the above mentioned new *in vitro* models for the liver should allow for the evaluation of interindividual variation and thus provide a promising perspective for future advances.

Nevertheless, the largest issue to overcome will be the necessary adjustments of the rules and regulations. This applies to toxicity testing in general, but it will be especially difficult for those rules and regulations that apply to human risk-estimation. Any new model will have to compete against the test that have become the golden standard over-time, namely the animal models. This, without a doubt, will prove to be a very lengthy process.

Interindividuele variatie in reactie op de blootstelling aan chemische verbindingen is een bekend verschijnsel in de menselijke populatie. [1-3]. Onder andere genetische factoren zijn voorgedragen als oorzakelijke factoren voor deze menselijke interindividuele variatie [1, 2]. Zo is bijvoorbeeld de interindividuele variatie in cytochroom P450 (CYP) enzym expressie en/of activiteit geassocieerd met idiosyncratische reacties op geneesmiddelen en de gevoeligheid voor carcinogenese [4-7]. Echter, de variatie in de hierboven genoemde factoren lijkt niet voldoende om de variatie in de respons tussen individuen volledig te kunnen verklaren. Daarom gaan we ervan uit dat veel van de oorzakelijke factoren voor interindividuele variatie en de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan deze variatie nog onbekend zijn.

Bovendien is de interindividuele variatie in de respons op blootstelling aan stoffen een belangrijke complicerende factor in de procedures betreffende de humane risicobeoordeling [8]. In een poging deze interindividuele variatie te includeren in het proces aangaande de risicobeoordeling van stoffen (genotoxische carcinogenen daargelaten), heeft men een 100-voudige veiligheidsfactor geïntroduceerd [9]. Deze factor is samengesteld uit twee afzonderlijke elementen die beiden een 10-voudige veiligheidsmarge vertegenwoordigen. Allereerst wordt een 10-voudige marge toegepast op proefdier-model gerelateerde data, de huidige gouden standaard in toxicologisch onderzoek, om zo te extrapoleren naar de humane situatie ervan uitgaande dat mensen gevoeliger zijn voor toxiciteit dan dieren [10, 11]. Vervolgens wordt nog een 10-voudige marge toegepast die moet compenseren voor de interindividuele variatie in gevoeligheid voor toxiciteit binnen de humane populatie [9, 12]. Als zodanig voorziet deze 100-voudige veiligheidsfactor in de mogelijkheid om een schatting te maken van een op dierenmodellen gebaseerde dosis voor een specifieke verbinding die voor mensen als veilig kan worden beschouwd op basis van dagelijkse blootstelling. Echter, in de afgelopen jaren is er controversie ontstaan rondom de 10-voudige factor die zou moeten corrigeren voor de interindividuele variatie in gevoeligheid binnen de humane populatie [13]. Een toename van kennis over de werkelijke interindividuele variatie binnen de humane populatie als zodanig en een beter inzicht in de moleculaire mechanismen onderliggend aan de respons op blootstelling aan stoffen helpen een minder willekeurige risicobeoordeling voor mensen te bewerkstelligen.

Daarnaast gaat het gebruik van proefdieren voor toxicologisch onderzoek gepaard met ethische en morele dilemma's en een zware

financiële last [14]. Ook is recentelijk discussie ontstaan betreffende de betrouwbaarheid en toepasbaarheid van data afkomstig van proefdiermodellen op de humane situatie [14]. Daarbij zijn knaagdiermodellen inherent verbonden aan een inteelt-gerelateerde genetische achtergrond, welke niet geschikt is voor de evaluatie van interindividuele variatie binnen de humane populatie. Bovengenoemde punten tonen aan dat er behoefte is aan betere, *in vitro* testmodellen bij voorkeur geoptimaliseerd voor toepassing binnen de humane situatie.

De lever is het belangrijkste orgaan dat is betrokken bij de bio-activatie van chemische verbindingen in reactieve verbindingen. Daarom is dit orgaan de voornaamste kandidaat voor de ontwikkeling van humane *in vitro* modellen voor het beoordelen van toxische reacties op blootstelling aan stoffen [15]. Verschillende cellijnen verkregen uit levercarcinomen zijn beschikbaar en worden regelmatig gebruikt in toxicologisch onderzoek [16-20]. Echter, deze cellijnen kunnen niet gebruikt worden voor de evaluatie van interindividuele variatie. Aangezien hepatocyten het meest voorkomende celtype in de lever vertegenwoordigen, vormen deze cellen een belangrijke kandidaat bij de ontwikkeling van een *in vitro* model dat de humane lever moet simuleren [21-23]. Verder, aangezien primaire humane hepatocyten (PHH) kunnen worden geïsoleerd uit ieder levensvatbaar leverweefsel van humane donoren, behoort de evaluatie van interindividuele variatie in toxische reacties tot de mogelijkheden. Een ander *in vitro* model voor de menselijke lever wordt vertegenwoordigd door precisie-gesneden humane leverslices (plakjes). In dit model wordt de biologische integriteit van de lever niet verstoord en zijn alle verschillende soorten levercellen vertegenwoordigd (dus niet alleen de hepatocyten) [21]. Net als de primaire humane hepatocyten, kunnen deze slices worden bereid van elk beschikbaar, levensvatbaar humaan leverweefsel waardoor de evaluatie van interindividuele variatie mogelijk is.

Naast betere cel modellen voor de evaluatie van toxische reacties zijn ook betere technieken beschikbaar gekomen die een genoom-brede aanpak bij het bestuderen van deze reacties op blootstelling aan stoffen mogelijk maken; de zogenaamde 'omics of array-gebaseerde technieken. Deze technieken beloven een hogere gevoeligheid dan de conventionele toxicologische testen. Deze technieken zouden in staat moeten zijn om al een respons op blootstelling te detecteren bij lage dosissen nog voordat er een fenotypische verandering optreedt, wat de voorspellende waarde van deze technieken verhoogd [24-27]. Verder levert het vermogen van deze technieken om genoom-breed te meten de mogelijkheid op om de moleculaire mechanismen die ten

grondslag liggen aan stof-gerelateerde reacties te bestuderen. Chips om genexpressie te bestuderen behoorden tot de eerste soort arrays die beschikbaar kwamen, maar die zijn nu aangevuld met onder andere miRNA en DNA-methylatie platvormen. Deze bieden de mogelijkheid om de epigenetische effecten van blootstelling aan stoffen te evalueren in toevoeging op de effecten op genexpressie niveau.

De hypothese in dit proefschrift is dat 'omics data afkomstig van *in vitro* modellen voor de humane lever ons in staat zullen stellen genen / sets van genen te definiëren die de variatie tussen individuen in de gevoeligheid voor blootstelling aan stoffen kunnen verklaren. Verder, zouden de data afkomstig van de epigenetische technieken ons in staat moeten stellen om te beoordelen of de epigenetische status van een individu de gevoeligheid van deze persoon betreffende de respons op blootstelling aan stoffen beïnvloedt.

Evaluatie van interindividuele variatie met behulp van precisie-gesneden humane leverslices

In **Hoofdstuk 2** hebben we precisie-gesneden humane leverslices gebruikt om zo te bepalen of de interindividuele variatie in basale enzymactiviteit (EA) en genexpressie (GE) niveaus in de lever predisponeren voor de variatie in toxiciteits-responsen, gebaseerd op het bepalen van de dosis-respons relaties voor verschillende prototypische lever-toxische stoffen. Basale niveaus van CYP GE en EA werden gemeten in precisie-gesneden humane leverslices. Daarnaast werden slices blootgesteld aan een dosisreeks van paracetamol (APAP), aflatoxine B1 (AFB), benzo(α)pyreen (BaP) of 2-nitrofluoreen (NF). Interindividuele variatie in geïnduceerde genotoxiciteit (COMET-assay en CDKN1A/p21 GE) en cytotoxiciteit (afgifte van lactaatdehydrogenase), gecombineerd met NQO1-en GSTM1-GE-geïnduceerde reacties voor oxidatieve stress en GE-reacties van verschillende CYP werden geëvalueerd. De benchmark dosis (BMD)-benadering werd toegepast als een hulpmiddel om de blootstellingsresponsen te modelleren op individueel niveau.

Variatie in basale CYP-niveaus, zowel GE als EA, lijken de variatie in de respons op blootstelling aan stoffen op een individueel niveau te verklaren. De belangrijkste parameters die interindividuele variatie na blootstelling verklaren, kunnen worden gedefinieerd door netwerkanalyse. Met betrekking tot NF duidt deze analyse op de betrokkenheid van CYP1B1 in het metabolisme van deze verbinding wat een nieuwe bevinding vertegenwoordigt. Ook, GSTM1 waarvan bekend

is dat het sterk varieert in expressie binnen de humane populatie, maar waarvan de variatie tot nu toe niet konden worden gekoppeld aan toxiciteit-responsen in patiënten vergiftigd door APAP, wordt in de netwerkanalyse geassocieerd met de interindividuele variabiliteit in APAP-metabolisme, afhankelijk van de individuele expressie van CYP-enzymen.

Deze studie toont aan dat de inclusie van interindividuele variatie in netwerkmodellering een werkwijze creëert voor het bepalen van essentiële en nieuwe parameters geassocieerd met stof-gerelateerd metabolisme. Van alle verbindingen is de interindividuele variatie in de cytotoxiciteitsrespons gebaseerd op BMDs het grootste na APAP-blootstelling (400-voudig). Deze hoge interindividuele variabiliteit komt overeen met bevindingen uit de literatuur betreffende de grote variabiliteit binnen de humane populatie ten aanzien van de gevoeligheid voor toxische reacties op APAP [28]. Bovendien, ligt deze variatie ook ver boven de 10-voudige marge die moet corrigeren voor interindividuele variatie binnen procedures voor humane risicoschatting. Deze informatie benadrukt de noodzaak van een grondigere evaluatie van interindividuele variatie in toxische reacties, met het oog op de nodige verbetering van kwantitatieve inschatting van de risico's voor een individu. Voor AFB, BaP en NF waren de verschillen in interindividuele variatie in de cytotoxiciteitsrespons afgeleid van BMDs veel lager (respectievelijk 6, 54, en 4-voudig).

Interindividuele variatie in primaire humane hepatocyten

Hoofdstuk 3 richt zich op de interindividuele variatie in genexpressie reacties en metaboliëtvorming in primaire humane hepatocyten (PHH) blootgesteld aan APAP. APAP behoort tot de groep van receptvrije geneesmiddel en is een van de meest gebruikte analgetica/antipyretica wereldwijd [29, 30]. Hoewel grote interindividuele variatie in de gevoeligheid voor APAP-geïnduceerd leverfalen is beschreven, zijn de exacte onderliggende factoren die deze variabiliteit in gevoeligheid veroorzaken nog grotendeels onbekend [31, 32].

Om de variabiliteit in respons op APAP beter te begrijpen werden de interindividuele verschillen in genexpressie veranderingen en APAP-metaboliëtformatie in PHH van verschillende donoren in vitro blootgesteld aan een niet-toxische tot toxische APAP-dosisreeks geëvalueerd. De interindividuele variatie in gen expressie niveaus werd gecorreleerd aan de interindividuele variatie in APAP-metaboliët niveaus

om te evalueren of verschillen in gen expressie niveaus de verschillen in APAP-metaboliet formatie niveaus zouden kunnen verklaren. Genenset over-representatie analyse werd toegepast om biologische interpretatie van de transcriptoom-gerelateerde resultaten mogelijk te maken. De biologische processen waarin de genen met de grootste interindividuele variatie in expressie betrokken zijn, omvatten leverregeneratie, ontstekingsreacties, mitochondriële stress-respons, hepatocarcinogenese, celcyclus en medicatie-effectiviteit. Daarnaast zou de interindividuele variatie in de expressie van deze genen geassocieerd zijn met de variabiliteit in de metaboliet niveaus van hydroxyl-APAP, methoxy-APAP en C8H13O5N-APAP-glucuronide. Deze genen/metabolieten kunnen dus van belang zijn in de context van medicatie-geïnduceerde leverschade, vooral als ze kunnen worden bevestigd in een humane *in vivo* situatie zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**. Bovendien lijkt de interindividuele variatie in genexpressie niveaus over het algemeen de variatie in metaboliet niveaus te overschrijden.

Zoals eerder vermeld, worden cellijnen tegenwoordig veel gebruikt als *in vitro* model voor de humane lever in toxicologisch onderzoek. Echter, deze cellijnen voorzien niet in de mogelijkheid tot de evaluatie van interindividuele variatie. In **Hoofdstuk 4** evalueren we in welke mate de data afkomstig van verschillende cellijnen vergelijkbaar zijn met de data van PHH, een *in vitro* model met interindividuele variatie. Hoewel eerdere studies voornamelijk gericht zijn op de vergelijking/toepasbaarheid van deze celtypes op basis van hun basale biotransformatie capaciteiten/CYP-induceerbaarheid [33-35], kozen wij voor een aanpak gebaseerd op een genoom-breed genexpressieprofiel, zowel op basaal niveau als op compound geïnduceerde genexpressie niveau. Daarvoor hebben we basale en AFB-en BaP-geïnduceerde genexpressie profielen in HepG2, HepaRG en PHH vergeleken.

Op basaal niveau verschillen levermodellen van elkaar wat betreft hun genoom-breed genexpressie niveau. PHH worden, zoals verwacht, gekenmerkt door grote interindividuele verschillen en zijn het meest vergelijkbaar met HepaRG. De genexpressie profielen geïnduceerd door blootstelling aan chemicaliën zijn meer vergelijkbaar tussen de cel modellen, vooral na BaP blootstelling. Processen betrokken bij het metabolisme van stoffen werden geïnduceerd in alle 3 de modellen, terwijl andere processen meer uitgesproken tot expressie komen in een bepaald cel model. Voorbeelden zijn transcriptomische modificaties van koolhydraat-gerelateerde genen (HepaRG) en receptor-gerelateerde genen (PHH) na BaP blootstelling, en celcyclus-gerelateerde genen (HepG2) na AFB behandeling. Dus op basaal niveau, zijn PHH beter

vergelijkbaar met HepaRG dan met HepG2, maar voor toepassing binnen de toxicogenomics lijken beide cellijnen even goed te presteren in vergelijking met PHH. Echter, de interindividuele variatie in het PHH model zorgt voor een veel breder en meer heterogeen beeld in de respons op blootstelling. Omdat deze interindividuele variatie niet kan worden vastgesteld door de cellijn modellen, gaat hun toepassing binnen de beoordeling van toxiciteits-risico's gepaard met de kans op een onvolledige evaluatie met betrekking tot de human populatie. Nu we duidelijke interindividuele variatie in basale en stof-geïnduceerde genexpressie niveaus hebben vastgesteld, blijft de vraag wat de oorzaak is van deze interindividuele verschillen. De invloed van epigenetische factoren zoals gen-methylatie, zijn voorgesteld als bijkomende factoren die het verschil in geïnduceerde genexpressie niveaus bij de mens zouden kunnen verklaren. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 5** bekeken in hoeverre de basale methylatie-status van een gen de expressie van dat gen beïnvloed in respons op blootstelling aan verbinding. In dit verband wordt in het bijzonder de nadruk gelegd op de interindividuele variatie van de DNA-schade respons.

Van PHH van verschillende donoren blootgesteld aan AFB of BaP (zie **Hoofdstuk 4**) werd de respons op DNA-schade geëvalueerd door μ H2Ax-kleuring. Deze resultaten werden gebruikt om de studiepopulatie in twee groepen te verdelen; een lage en een hoge responsgroep, gebaseerd op de BMD voor de DNA-schade respons. Genen uniek in hun genexpressie respons voor een van deze twee groepen werden beoordeeld op hun basale methylatie-status en basale genexpressie niveaus.

Hoewel duidelijke verschillen in de respons op DNA-schade tussen hoge en lage responsgroepen kunnen worden gedefinieerd, lijkt basale methylatie-status slechts minimaal bij te dragen aan een verklaring voor deze variatie. Ook lijkt interindividuele variatie in genexpressie op basaal niveaus niet te zijn gerelateerd aan de variatie tussen individuen in de basale gen methyleringsstatus, wat vervolgens weer niet wordt weerspiegeld in de variatie tussen individuen in genexpressie responsen. Dus, de algemene conclusie is dat de interindividuele variatie in de basale methyleringsstatus slechts beperkte aanvullende informatie biedt over de gevoeligheid voor blootstelling aan carcinogenen van groepen/individuen. Mogelijk zijn de mechanismen achter de regulatie van genexpressie door methylatie gecompliceerder dan momenteel erkend. De inclusie van andere (epi) genetische factoren, zoals miRNA's, zouden kunnen helpen ons vermogen tot interpretatie en begrip van interindividuele variatie te complementeren.

Interindividuele variatie in humane *in vivo* reacties

Hoewel *in vitro* humane levermodellen dusver nuttig zijn gebleken om interindividuele variatie te evalueren is het ultieme model natuurlijk de *in vivo* humane lever. Echter, vanwege voor de hand liggende ethische bezwaren behoort het opzettelijk blootstellen aan toxische dosissen van verbinding niet tot de mogelijkheden met dit model. Verder is de toegankelijkheid van de lever beperkt vanwege de anatomische positie van dit orgaan. Echter, het is bewezen dat bloed als referentie of surrogaat weefsel gebruikt kan worden om leverfunctie te evalueren, ook na de blootstelling aan lichaamsvreemde stoffen [36-38].

In **Hoofdstuk 6** hebben we de interindividuele verschillen in transcriptie reacties in bloedcellen van diverse vrijwilligers blootgesteld aan relatief lage, therapeutische dosissen APAP geëvalueerd. Een serie van standaard klinisch-chemische lever tests werd gebruikt om te controleren op mogelijke tekenen van leverschade. Een procedure vergelijkbaar met die in **Hoofdstuk 2** werd gebruikt om genexpressie veranderingen na blootstelling aan APAP te evalueren. Ook interindividuele variatie in APAP-metaboliet vorming in bloed en urine werd bepaald. Voor zover bij ons bekend, is dit de eerste studie die de genoom-brede humane miRNA expressie veranderingen in bloedmonsters evalueert van gezonde vrijwilligers blootgesteld aan APAP.

Veel bekende, maar ook verschillende nieuwe APAP-metabolieten werden gedetecteerd, in het bijzonder met betrekking tot hepatotoxiciteit gerelateerde processen en het oxidatieve metabolisme van APAP. Ook de in **Hoofdstuk 2** beschreven metabolieten die mogelijke interessant zijn in het perspectief van medicatie-geïnduceerde leverschade worden bevestigd in deze *in vivo* studie. Veranderingen in de transcriptie van genen wijzen op immuun-modulerende effecten en oxidatieve stress gerelateerde in een reactie op APAP blootstelling.

'Omics technieken blijken beter te presteren dan de klinisch-chemische tests en onthullen nieuwe processen in reactie op APAP bij de mens. Hoewel er geen definitieve conclusie over de mogelijke immuun-toxische effecten van APAP kan worden getrokken uit dit onderzoek, zijn er duidelijke aanwijzingen dat het immuunsysteem wordt geactiveerd, zelfs na inname van een lage dosis APAP. Ook, de betrokkenheid van oxidatieve stress gerelateerde genexpressie reacties vergelijkbaar met die gezien na blootstelling aan een hoge dosis APAP suggereert het optreden van mogelijke pre-toxische effecten van

therapeutische APAP-doses. Mogelijk zijn deze effecten gerelateerd aan een dosis-afhankelijke verhoging van hepatotoxiciteit-gerelateerde metaboliet niveaus. Bovendien kan de interindividuele variatie miRNA expressiepatronen worden gerelateerd aan de interindividuele variatie in genexpressie reacties. Daarom moeten miRNA's worden beschouwd als een nuttige toevoeging op de kennis die de interindividuele variatie binnen de humane populatie kan verklaren.

Conclusies

Netwerk analyse (**Hoofdstuk 2**) is nuttig gebleken bij het bepalen van de basale CYP genexpressie en enzymactiviteit niveau als de belangrijkste parameters die interindividuele variatie na blootstelling beïnvloeden. De grote interindividuele variatie in metabole genen, vooral CYP, word bevestigd in **Hoofdstuk 5**.

PHH zijn op basaal genexpressie niveau, verschillend van HepaRG en HepG2, twee-carcinoom afgeleide cel modellen die momenteel worden gebruikt in toxiciteit testen (**Hoofdstuk 4**). PHH, HepaRG en HepG2 worden meer vergelijkbaar met betrekking tot hun genexpressie profielen na blootstelling aan verbinding. Toch geeft het PHH-model een veel breder en meer heterogeen beeld van de reacties op blootstelling aan verbinding door de inclusie van de interindividuele variatie tussen donoren.

Interindividuele variatie in genexpressie reacties konden worden gedetecteerd in alle niet carcinoma gebaseerde *in vitro* en *in vivo* levermodellen toegepast in dit proefschrift (**Hoofdstuk 2,3 en 6**). Interindividuele variatie in sommige parameters overschrijdt de 10-voudige marge die wordt verondersteld de interindividuele variatie binnen de humane populatie te vertegenwoordigen in toxiciteitstesten. Deze factoren omvatten BMDs gebaseerd op genexpressie reacties en cytotoxiciteit reacties, maar ook niveaus van metabolietvorming. Daarnaast lijkt de inclusie van data over interindividuele variatie in miRNA expressie niveaus behulpzaam zijn bij het verklaren van de grote variatie tussen individuen in reactie op APAP blootstelling (**Hoofdstuk 6**).

De combinatie van meerdere 'omics technieken (bijv. genomics en proteomics) is zeer nuttig gebleken bij het bepalen van metabolieten die kunnen worden gebruikt om interindividuele variatie in de respons op APAP-blootstelling (**Hoofdstuk 3 en 6**) te monitoren. De toevoeging van epigenetische gegevens in een poging om interindividuele variatie

verklaren was succesvoller betreffende de toevoeging van informatie over miRNA expressie dan met de toevoeging van methylatie-gerelateerde data (**Hoofdstuk 5 en 6**).

Concluderend, bevestigt het onderzoek in dit proefschrift de aanwezigheid van aanzienlijke interindividuele variatie in de reacties op blootstelling aan toxische stoffen binnen de humane populatie. Basale CYP enzymactiviteit en genexpressie niveaus, als ook chemisch geïnduceerde genotoxiciteit, cytotoxiciteit en genexpressie niveaus vertonen allen duidelijke variatie tussen levercellen van individuele donors. Naar onze mening zou de implementatie van kennis over humane interindividuele variatie moeten leiden tot de ontwikkeling van minder willekeurige procedures voor de schatting van humane risico's en zou een beter begrip van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de reacties op verbindingen verkregen moeten kunnen worden.

Aanbeveling voor toekomstige richtingen

Tijdens de laatste jaren is het besef voor het belang van de evaluatie van interindividuele variatie toegenomen, samen met een oplopende vraag naar de vervanging van proefdiermodellen. Echter, om volledig te kunnen begrijpen hoe interindividuele variatie toxiciteitsreacties beïnvloed zullen grote hoeveelheden data van een grote groep van individuen verzameld moeten worden om zo een dataset te kunnen creëren die een betrouwbare vertegenwoordiging van de heterogeniteit binnen de humane populatie weerspiegelt. Hiervoor is een relevant humaan cel model dat gemakkelijk toegankelijk en op grote schaal toepasbaar is noodzakelijk. Betreffende levermodellen is dit (nog) niet beschikbaar. De bestaande cellijnen die wel talrijk beschikbaar en goedkoop zijn, houden geen rekening met interindividuele variatie. PHH en lever slices zijn niet beschikbaar in grote hoeveelheden en komen met hoge technische eisen.

Onlangs werden verschillende nieuwe *in vitro* modellen ontwikkeld. Een van deze modellen is gebaseerd op hepatocytagtige cellen die kunnen worden verkregen uit de differentiatie van humane embryonale stamcellen [39]. Een vergelijkbaar model is het humane geïnduceerde pluripotente stamcel-model [40]. Dit model heeft als voordeel dat de genetische achtergrond van de cellen afkomstig van de stamcellen dicht bij de genetische achtergrond van normale hepatocyten ligt. Verder zijn de technieken om cellen te kweken verbeterd, waardoor voor het kweken van cellen in

3D- of microweefsel formatie tot de mogelijkheden behoort. Deze nieuwe kweektechnieken zouden de natuurlijke omgeving van de cel in de lever na moeten bootsen en op die manier onder andere een verbetering van de metabole capaciteit van de cellen teweeg moeten brengen in vergelijking met de normale 2D-kweken [40]. Bovendien zijn zogenaamde co-kweken ontwikkeld die zowel primaire parenchym en niet-parenchymale levercellen bevatten. Ook deze cel modellen vertegenwoordigen een *in vivo*-achtige weergave van de lever met verbeterde functionele mogelijkheden [41]. In alle hierboven genoemde nieuwe *in vitro* modellen voor de lever behoort de evaluatie van interindividuele variatie tot de mogelijkheden waardoor een veelbelovend toekomstbeeld wordt geschapen

Echter de grootste uitdaging ligt waarschijnlijk in de nodige aanpassingen van de wetten en regelgevingen. Dit geldt in het algemeen voor het testen van toxiciteit, maar is in het bijzonder van toepassing op de wetten en regelgevingen die gepaard gaan met de humane risicobeoordeling. Elk nieuw model zal moeten concurreren met de test die overtijd de gouden standaard hebben gevormd, zoals de proefdiermodellen. Dit zal zonder twijfel een zeer langdurig proces blijken te zijn.

References

1. Omiecinski, C.J., et al., Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*, 2011. 120 Suppl 1: p. S49-75.
2. Urquhart, B.L., R.G. Tirona, and R.B. Kim, Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol*, 2007. 47(5): p. 566-78.
3. Johansson, I. and M. Ingelman-Sundberg, Genetic Polymorphism and Toxicology—With Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicological Sciences*, 2011. 120(1): p. 1-13.
4. Daly, A.K., Using genome-wide association studies to identify genes important in serious adverse drug reactions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. 52: p. 21-35.
5. Guengerich, F.P., Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*, 2006. 8(1): p. E101-11.
6. Guengerich, F.P., Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008. 21(1): p. 70-83.
7. Hussaini, S.H. and E.A. Farrington, Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opin Drug Saf*, 2007. 6(6): p. 673-84.
8. Bogen, K.T. and R.C. Spear, Integrating uncertainty and interindividual variability in environmental risk assessment. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, 1987. 7(4): p. 427-36.
9. Lehman, A.J. and O.G. Fitzhugh, 100-fold margin of safety. *Assoc.Food Drug Off. U.S.Q. Bull.*, 1954. 18: p. 33–35.
10. European-Commission, Opinion of the Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment on The BUAV-European Coalition to End Animal Experiments Report: The Way Forward - Action to End Animal Toxicity Testing, 2004.
11. The-Staff-of-ACSH, Of Mice and Mandates: Animal Experiments, Human Cancer Risk, and Regulatory Policies, 1997.
12. Dorne, J.L.C.M. and A.G. Renwick, The Refinement of Uncertainty/Safety Factors in Risk Assessment by the Incorporation of Data on Toxicokinetic Variability in Humans. *Toxicological Sciences*, 2005. 86(1): p. 20-26.
13. KEMI-Karolinska-Institute-Sweden. HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT - Proposals for the use of assessment (uncertainty) factors; Application to risk assessment for plant protection products, industrial chemicals and biocidal products within the European Union. 2003; Available from: http://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/Rapporter/Rapport1_03.pdf.
14. Levy, N., The use of animal as models: ethical considerations. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, 2012. 7(5): p. 440-2.
15. Fasinu, P., P.J. Bouic, and B. Rosenkranz, Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr Drug Metab*, 2012. 13(2): p. 215-24.
16. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 1980. 209(4455): p. 497-9.
17. Morris, K.M., et al., Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J Clin Invest*, 1982. 70(4): p. 906-13.
18. Aninat, C., et al., Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and

- nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 2006. 34(1): p. 75-83.
19. Cerec, V., et al., Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology*, 2007. 45(4): p. 957-67.
 20. Guillouzo, A., et al., The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact*, 2007. 168(1): p. 66-73.
 21. de Graaf, I.A., et al., Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature protocols*, 2010. 5(9): p. 1540-51.
 22. Kmiec, Z., Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2001. 161: p. III-XIII, 1-151.
 23. Treyer, A. and A. Musch, Hepatocyte polarity. *Compr Physiol*, 2013. 3(1): p. 243-87.
 24. Beger, R.D., J. Sun, and L.K. Schnackenberg, Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010. 243(2): p. 154-66.
 25. Harrill, A.H. and I. Rusyn, Systems biology and functional genomics approaches for the identification of cellular responses to drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008. 4(11): p. 1379-89.
 26. Vinayavekhin, N., E.A. Homan, and A. Saghatelian, Exploring disease through metabolomics. *ACS Chem Biol*, 2010. 5(1): p. 91-103.
 27. Vlaanderen, J., et al., Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med*, 2010. 67(2): p. 136-43.
 28. Spielberg, S.P., Acetaminophen toxicity in human lymphocytes in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1980. 213(2): p. 395-8.
 29. Lee, W.M., Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology*, 2007. 46(4): p. 966-70.
 30. Kuehn, B.M., FDA focuses on drugs and liver damage: labeling and other changes for acetaminophen. *JAMA*, 2009. 302(4): p. 369-71.
 31. Prescott, L.F., Paracetamol overdose. *Pharmacological considerations and clinical management*. *Drugs*, 1983. 25(3): p. 290-314.
 32. Rannug, U., et al., An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1995. 327(1-2): p. 179-200.
 33. Hart, S.N., et al., A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos*, 2010. 38(6): p. 988-94.
 34. Jennen, D.G., et al., Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol Sci*, 2010. 115(1): p. 66-79.
 35. Gerets, H.H., et al., Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol*, 2012. 28(2): p. 69-87.
 36. Liew, C.-C., et al., The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2006. 147(3): p. 126-132.
 37. Mohr, S. and C.-C. Liew, The peripheral-blood transcriptome: new insights into

- disease and risk assessment. *Trends in Molecular Medicine*, 2007. 13(10): p. 422-432.
38. Rockett, J.C., et al., Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 2004. 194(2): p. 189-99.
 39. Yildirimman, R., et al., Human embryonic stem cell derived hepatocyte-like cells as a tool for in vitro hazard assessment of chemical carcinogenicity. *Toxicol Sci*, 2011. 124(2): p. 278-90.
 40. Mathur, A., et al., Human induced pluripotent stem cell-based microphysiological tissue models of myocardium and liver for drug development. *Stem cell research & therapy*, 2013. 4 Suppl 1: p. S14.
 41. Kostadinova, R., et al., A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 268(1): p. 1-16.